

学校编码: 10384
学号:

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文
角质细胞生长因子 (KGF) 的表达及生物学活性
研究和成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 抑制
剂稳定转染筛选模型的建立

Study of the expression and bioactivity of KGF

The construction of FGFR stable transfection screen model

许莉妍

指导教师姓名: 郑忠辉 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩时间: 2009 年 月 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: 教授

评 阅 人:

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

摘要

本论文分为两章，第一章研究了角质细胞生长因子的表达及其生物学活性，第二章建立了基于报告基因的成纤维细胞生长因子受体（FGFR）抑制剂细胞筛选模型。

角质细胞生长因子（keratinocyte growth factor, KGF）是Rubin 等（1989）从胚胎肺成纤维细胞培养上清中发现的，这种细胞因子的靶细胞为上皮细胞，分泌细胞为各种来源的间质细胞，其作用是促进上皮细胞的生长、分化、迁移。在治疗皮肤创伤、角膜损伤、消化性溃疡及放化疗损伤防护等方面具有诱人的应用前景。本章在前人工作的基础上，主要研究了工程菌的诱导表达条件，产物发酵及纯化，产物的生物学活性，以及烫伤药制备和药效研究。

对工程菌表达融合蛋白GST-KGF 的条件进行研究，结果表明GST-KGF 可溶表达的最佳条件为诱导温度22℃，诱导物IPTG浓度0.5mmol/L，诱导时菌体密度OD₆₀₀约为0.96，诱导时间5h。在该诱导表达条件下，摇瓶发酵实验每升发酵液GST-KGF的产量为28.39mg，占菌体总蛋白的8.66%。罐上发酵体系中的GST-KGF产量为277.8mg/L，占菌体总蛋白的29%。

采用GSH-sepharose凝胶对GST-KGF蛋白进行亲和吸附，并用凝血酶切除融合蛋白N端的GST部分，最后得到电泳纯的KGF，分子量为17KD左右。在罐上发酵体系中，1L发酵液可得83.0mgKGF蛋白，总纯化率为50%。并且利用ELISA实验检测了所得KGF的免疫学活性。

在上述工作的前提下，我们对KGF的生物学活性进行了研究，对小鼠背部进行深Ⅱ度烫伤，检测KGF对伤口的修复能力，最终我们确定使用浓度为10 μg/创面的KGF可以很好地促进伤口的愈合。在此前提下，进一步研制了三种不同基质的KGF烫伤药，并且检测三种配方烫伤药对小鼠伤口愈合的促进作用，发现配方一的烫伤药乳膏有明显的促进伤口愈合的能力，其药效甚至比市面上的某些烫伤药还好。其愈合率与愈合同期的阳性药物相比，普遍提高了30%-50%。结果证明，所研制的配方一烫伤乳膏有良好的治疗功效，具有较好的应用前景。

碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factors, bFGF）是1970年代第一次从牛的脑组织中分离出来的。同其它成纤维细胞生长因子一样，它具有有丝分裂原性。成纤维细胞生长因子具有多重的生物学活性，包括细胞的增殖、

分化和迁移。它们也可以激发原癌基因诱发肿瘤的形成和发展。本文的研究内容包括FGFR (fibroblast growth factors receptor, FGFR) 抑制剂稳定筛选模型的建立, 利用此稳定筛选模型筛选微生物发酵粗提物, 并且利用western-blot检测具有活性的粗提物对bFGF信号传导通路的影响。

利用稳定转染的方法共转染 pCDNA3.1(-) 和 pGL3-SFiRE 双质粒于 NIH3T3 细胞, 通过 G418 抗性和荧光素酶反应两步筛选, 建立稳定的筛选模型, 并得到了 F10-9, A7-12, E1-9 这三株 pGL3-SFiRE-NIH3T3 稳定细胞株。通过这个筛选模型的筛选, 最终得到了 191、LX、hZL02a-1、HQGa-9、Ty02b-5 这 5 种具有抑制活性的粗提物。利用 western-blot 检测这些具有活性的粗提物对 FGF 信号传导通路中关键酶的影响以及对 FGFR 的抑制情况。最终发现 Ty02b-5 和 180 这两种粗提物抑制了 FGFR 的磷酸化, 并且在检测 p-PLC γ 时发现经过这两种粗提物处理后 p-PLC γ 的量明显减少。说明两种粗提物中的某种成分可能是我们所寻找的 bFGFR 的抑制剂, 并且通过 PLC γ 途径对 bFGF 的信号传导产生影响。

本部分的工作是阶段性的, 至于这两种粗提物中的哪种成分对 FGFR 存在抑制, 还需要通过活性追踪实验进一步确定, 他们在 FGFR 上的具体作用位点及作用机制也有待进一步研究。

关键词: 角质细胞生长因子 生物学活性 成纤维细胞生长因子受体 稳定转染 筛选 抑制剂

Abstract

The thesis consist of two chapters,the first part is about study of the expression and bioactivity of KGF,the second part maily about the construction of FGFR screen model based on report gene.

Keratinocyte growth factor (KGF) was purified from embryonic fibroblast culture fluid(Rubin et al.1989) which act specific on epithelial cells.Releasing by various mesenchymal cells, KGF can stimulate the proliferation, differentiation and migration of epithelial cells.A serious studies have provided insight into the function of KGF in repair processes of various tissues and organs, including skin, cornea, bowel. In addition, it is a protective factor for gastrointestinal injury induced by radiation and chemotherapy. Based on previous work, this paper focus on the expression, purification ,bioactive test of KGF and the research of scald agents.

By changing the inducing temperature, inducer IPTG concentration, the density of bacteria and inducing time, the satisfying condition for expression of soluble fusion protein GST-KGF could be obtained at 22℃ ,0.5mmol/L IPTG, OD₆₀₀ equals to 0.96, 5h inducing time. Under the improved condition, the soluble GST-KGF comprised about 8.66% of total cellular protein and 28.39mg GST-KGF could be harvested in 1L fermentation. In the 50L fermentation system ,the soluble production up to 277.8mg/L which comprised about 29%of total cellular protein.

A method which combined affinity chromatography and thrombin incubation was used to achieve KGF purification since the fusion protein GST-KGF could bind to GSH-Sepharose 4B and GST could be remove by thrombin.The 17KD KGF derived from GST-KGF was purified to homogeneity.83.0mg purified KGF, a total recovery of 29.9% KGF, was harvested.ELISA analysis showed that the purified KGF could be detected by rabbit against human KGF.

Based on the previous work,the research on bioactivity of KGF was carried by the deep II scald on the back of mice.Results show that the satisfying concentration of KGF used on the wound was 10μg.For the further study ,three different scald agents were made to detect the activity.The results show that the scald cream we made

great promoted the wound healing which the healing rate is 30%-50% higher compare to the positive drugs. All the results prove that more the scald cream worth to be further developed.

The basic fibroblast growth factors (bFGF) which was one member of fibroblast growth factors, was first isolated as mitogens from bovine brain tissue in the 1970s. Fibroblast growth factors and their signaling receptors have been associated with multiple biological activities, including proliferation, differentiation and motility. Consequently, they have evoked interest as candidate oncogenes with the potential to initiate and/or promote tumorigenesis. This paper focus on the construct of stability screen model of FGFR (fibroblast growth factors receptor, FGFR), the screen of extracts and exploring the the potential mechanism which these extracts act on the FGF signal pathway.

We construct the stability screen model by the stable co-transfection of two plasmids into the NIH3T3 cells and finally we get three stable pGL3-SFiRE-NIH3T3 cell line which are F10-9, A7-12, E1-9. Furthermore, by screen the extracts we found the extracts NO.191, LX, hZL02a-1, HQGa-9, Ty02b-5 which have the potential inhibition activity. In addition, the mechanism research show that NO. Ty02b-5 and 180 could Inhibit the phosphorylation of FGFR, and their potential signal pathway were the PLC γ pathway.

However more research need to discover the exact component which have the inhibition ability and the mechanism of they act on the FGFR.

Key words: keratinocyte growth factor bioactivity fibroblast growth factor receptor
stable transfection screen inhibitor

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III

第一章 角质细胞生长因子（KGF）的表达及生物学活性研究.....1

1 前言	1
1.1 KGF 概况.....	1
1.2 表达调控	3
1.3 KGF 受体研究	3
1.4 KGF 生物学功能.....	4
1.5 KGF 开发研究进展.....	12
1.6 本课题意义与研究内容.....	13
2 材料与方法	14
2.1 材料.....	14
2.2 方法	17
3 结果与分析	27
3.1 重组质粒 KGF-pGEX-4T-1 的构建.....	27
3.2 KGF-pGEX-4T-1 的序列鉴定.....	28
3.3 GST-KGF 蛋白的表达.....	29
3.4 rhKGF 对小鼠烫伤面愈合的促进作用（烫伤预实验）.....	36
3.5 烫伤药对小鼠烫伤面愈合促进作用的检测.....	38
4 讨论	42
4.1 GST-KGF 融合蛋白的表达.....	42
4.2 GST-KGF 蛋白的纯化.....	43
4.3 KGF 生物学活性的检测.....	43
5 结论与展望	47

第二章 成纤维细胞生长因子受体（FGFR）抑制剂稳定筛选模型的建立.....49

1 前言	49
1.1bFGF 的理化及一般生物学特点	50
1.2 FGFR 及信号传导.....	51
1.3 bFGF 与肿瘤的关系.....	53
1.4 针对 bFGF 生物学作用在肿瘤治疗中的研究进展	55
1.5 本课题研究意义	58
2 材料与方法	59
2.1 材料	59
2.2 方法	63

3 结果与分析	67
3.1 pGL3-SFiRE-NIH3T3 稳定细胞株的构建.....	67
3.2 粗提物筛选实验	72
3.3 Western blot 检测粗提物对 bFGF 信号传导通路的抑制.....	74
4 讨论与结论	77
4.1 细胞株的选择	77
4.2 稳定转染细胞株药物筛选模型的建立	77
4.3 粗提物筛选	77
4.4 Western-blot 实验检测 FGF 信号传导通路受抑制实验.....	78
4.5 结论与展望	78
参考文献	80
缩略语表.....	91
致谢.....	92

Catalogue

Abstrat in chinese.....	I
Abstract in English.....	III
 Chapter 1 Study of the Expression and Bioactivity of KGF.....	 1
1 Introduction.....	1
1.1 General information of KGF	1
1.2 Regulation of KGF expression	3
1.3 Research of KGFR.....	3
1.4 Bioactivity of KGF	4
1.5Research progress of KGF	12
1.6 Purpose and means of this Thesis	13
2 Materials and Methods.....	14
2.1 Materials	14
2.2 Methods.....	17
3 Results and Analysis	27
3.1Construct of KGF-pGEX-4T-1plasmid.....	27
3.2 Analysis of KGF-pGEX-4T-1	28
3.3 The expression of GST-KGF protein	29
3.4 The test of KGF on the healing of wound	36
3.5 The test of scald agents on the healing of wound	38
4 Discussion	42
4.1 The expression of GST-KGF	42
4.2 The purification of GST-KGF	43
4.3 The test of KGF bioactivity	43
5 Conclusions and prospect.....	47
 Chapter 2 The Construction of FGFR Stable Transfection Screen Model.....	 49
1 Introduction.....	49
1.1The Physicochemical and biology feature of bFGF	50
1.2 FGFR and signal transduction	51
1.3 bFGF and tumor	53
1.4 Progress of the tumor therapy by bFGF.....	55
1.5 Purpose and means of this Thesis.....	58
2 Materials and Methods.....	59
2.1 Materials	59
2.2 Methods.....	63
3 Results and Analysis	67
3.1 The construction of pGL3-SFiRE-NIH3T3 cell	67

3.2The screen of microbial extracts.....	72
3.3 The test of bFGF signal transduction by Western blot.....	74
4 Discussion and Conclusions.....	77
4.1 The choose of cell	77
4.2 The constrction of stable tansfencion screen model	77
4.3The screen of mocrobial extracts.....	77
4.4 The test of FGFR inhibition.....	78
4.5 Conclusions and prospect.....	78
REFERENCES	80
ABBREVIATIONS.....	91
ACKNOWLEDGEMENTS.....	92

第一章 角质细胞生长因子（KGF）的表达及生物学活性研究

1 前言

当前社会由于意外创伤造成的死亡一直高居不下，不但给社会造成极大的经济负担，给人们的生活更是造成极大的痛苦。有研究表明在发达国家的致死原因中，创伤致死占据了第四位，而在发展中国家创伤致死所占的总死亡率比发达国家的还要高^[1]。因此寻找治疗创伤的高效药物，减轻病患的痛苦已经引起科研人员的高度重视。在人们不断地探索过程中，渐渐发现某些生长因子具有很好的创伤修复作用。生长因子与创伤愈合有着密切的关系，加强这方面的研究探讨其中的机理，不仅有助于深化和完善创伤愈合的理论，还为生长因子的临床应用提供理论基础和依据。随着有关研究的不断深入，可以预期生长因子的临床应用将会更加广泛地为创伤愈合取得更快更好的疗效带来希望。已知的生长因子至少有50余种，其中相当一部分有潜在的临床应用价值。但目前应用于临床的生长因子寥寥无几，因此进一步弄清各种生长因子在组织修复中的作用并努力将更多有应用价值的生长因子应用于临床也是一项重要的任务。

1.1 KGF 概况

角质细胞生长因子（keratinocyte growth factor, KGF）是Rubin 等（1989）从胚胎肺成纤维细胞培养上清中发现的，这种细胞因子的靶细胞为上皮细胞，分泌细胞为各种来源的间质细胞，其作用是促进上皮细胞的增殖和生长^[2]。KGF的氨基酸序列显示它属于成纤维细胞生长因子（FGF）家族，这一家族包括有酸性FGF（aFGF, FGF-1），碱性FGF（bFGF, FGF-2），int-2（FGF-3），hst/K-FGF（FGF-4），FGF-5, FGF-6，KGF（FGF-7），FGF-8和FGF-9等18个家族成员。KGF 和其他FGFs的同源区域包括近羧基端约2/3 KGF 编码片段，在该区域，KGF 片段30% ~ 50% 同源于FGF 家族的其他18 种蛋白^[3]。

KGF 基因位于15 号染色体（15q15-q21.1），包括3 个外显子和2 个内含子，产生1 个3.853 kb 的mRNA。启动子区位于-225/+190 区，具典型的TATA（31 bp）

和CCAAT (50 bp) , 为顺式作用调控因子 (如IL-6、毛喉素) 提供结合位点, 1503/-775 区存在抑制因子的结合部位^[4]。KGF 的cDNA 编码194 个氨基酸, 包含一分泌所需的信号肽和N 端的糖基化位点。重组人KGF (recombinant human KGF, rhKGF) 在细菌中表达时, 产生分子量21kDa 的活性蛋白质, rhKGF 与天然的KGF 分子量的差异主要是因为哺乳动物中表达的KGF 进行了糖基化修饰, 但这种翻译后的修饰对于其生物活性不是必需的, 而且rhKGF 的活性约是从成纤维细胞培养液中分离得到的天然KGF 的10 倍^[5]。KGF 的N 末端是由12 条反向平行的链构成的三叶草型模序, KGF 的受体结合特异性、有丝分裂原特性及其受体介导的磷酸化功能均存在于其中 (Fig. 1) 。肽链前23 个氨基酸的缺失并不降低KGF 促有丝分裂活性, 但随后的6 个氨基酸缺失则极大降低了KGF 的生物活性^[6]。

天然KGF 的稳定性差于其他家族成员, 活性易受环境影响, 生物半衰期短, 并且缺乏组织选择性。在50℃孵育10 min 活性不受影响, 60℃孵育10 min 活性降低68%, 100℃孵育3 min 后则不能检测到活性。KGF 在0.5 mol/L 乙酸中室温放置60 min, 活性下降14%。KGF 应用于创面, 易受创面蛋白酶的影响, 稳定性较差^[7]。

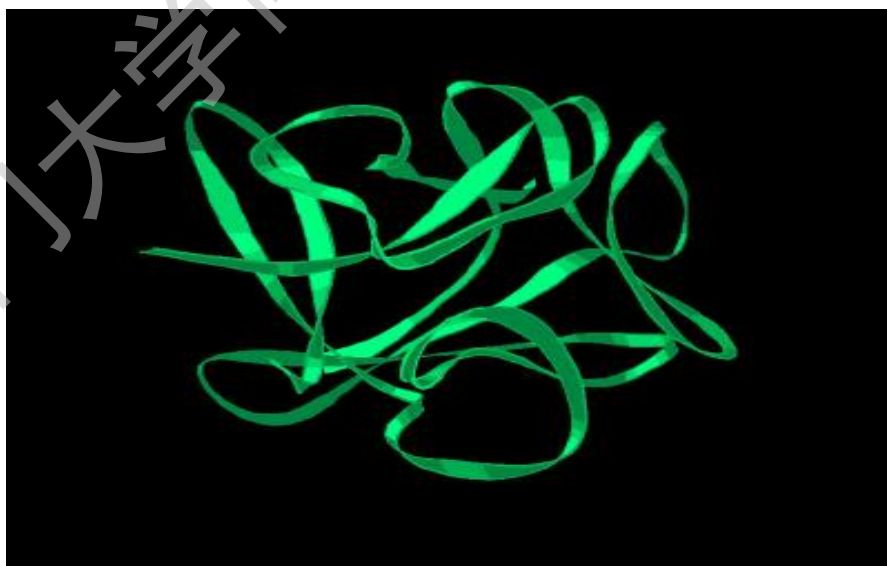


图 1 KGF 分子模型^[8]

Fig.1 The KGF Molecule model

1.2 表达调控

KGF 表达于间质细胞, 通过旁分泌机制分泌, 与表达于上皮细胞的受体 KGFR 特异性结合, 通过间充质-上皮相互作用方式在器官发育及维持成人器官稳定性方面起重要作用。已经证实, 胚胎、新生儿和成人上皮细胞起源的成纤维细胞和来自肺、肝、角膜、皮肤、乳腺、胃肠道、肾、膀胱、前列腺、卵巢等器官的间质细胞以及血管内皮细胞、平滑肌细胞均可表达 KGF, 而内皮细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、黑色素细胞不表达 KGF^[9, 10]。KGF 通路受到多种因素调控, 具体的调控因素可以大致分为以下几类: ①细胞因子: KGF 表达的上调受细胞因子和调控元件的影响。炎症浸润部位巨噬细胞和多核白细胞产生的炎性因子 IL-1、IL-6 等, 刺激多种来源的成纤维细胞合成 KGF mRNA 及其蛋白产物。角质化细胞通过释放 IL-1 β 调整成纤维细胞 KGF 表达, IL-1 β 是最有效的成纤维细胞 KGF 诱导物, 通过 c-Jun 途径发挥作用^[11]。PDGF-BB 和 TGF- α 亦可诱导 KGF 表达。②激素: 包括雄激素、雌激素和糖皮质激素, 是 KGF 表达的重要调控因素。雄激素和雌激素能促进 KGF 表达, 而糖皮质激素显著降低 KGF mRNA 表达。③其他: KGF 与 FGFR-2-III b 的结合必须有 HSPG 存在; KGF 与 I、III 型胶原的结合特性在某种程度上决定了其空间分布的特异性; 酪氨酸 769 是一个关键 KGFR 信号转导调整器, 调整 KGFR 结合, 参与与有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的完全激活作用有关的磷脂酶 C γ 酪氨酸磷酸化, 通过调整 FGF 受体作用底物 2 酪氨酸磷酸化引起细胞增殖^[12]; 阿糖腺苷刺激提高 KGF 的基因表达水平及细胞外蛋白水平^[13]; 超声治疗显示成纤维细胞早期 KGF 表达增加^[14]。

1.3 KGF 受体研究

FGF 做为最大的生长因子家族之一, 是通过与其受体结合发挥其生物学作用。由 4 种基因编码出 7 种 FGF 受体, 它们分别是 FGFR 1b, FGFR 1c, FGFR 2b, FGFR 2c, FGFR 3b, FGFR 3c, 和 FGFR 4。FGFR 主要有胞外的 3 个免疫球蛋白样结构 (D1, D2, D3), 跨膜结构以及胞内具有酪氨酸激酶活性结构^[15]。胞外区, D1 与 FGF-HS-FGFR 复合体的形成没有直接的关系, 它的存在与自我抑制有关。肝素

硫酸多糖的结合区域在D2区，D3区的变化使得FGFR存在7种异构体（图2）。

FGF各家族成员对不同的受体亲和力也不同。KGF的受体为FGFR2b，并且只能专一性地与其结合。关于FGF家族成员与其受体的结合形式，目前主要有FGF:FGFR 1: 2和FGF:FGFR 2: 2两种方式。KGF与FGFR2b的结合方式主要以1: 2的方式结合，并且肝素多糖的长度以及硫酸基的数目和分布都会影响其与FGF的亲和程度。与KGF具有最高亲和度的肝素硫酸多糖是八聚糖（7,8-S-OctaF7）具有7, 8个硫酸基。与其它具有较多硫酸基的肝素硫酸多糖不同的是，它倾向与FGFR二聚体结合从而形成FGF-HS-FGFR复合体。而其它具有较多硫酸基的肝素多糖则倾向先与FGF结合，再形成复合体^[16,17]。

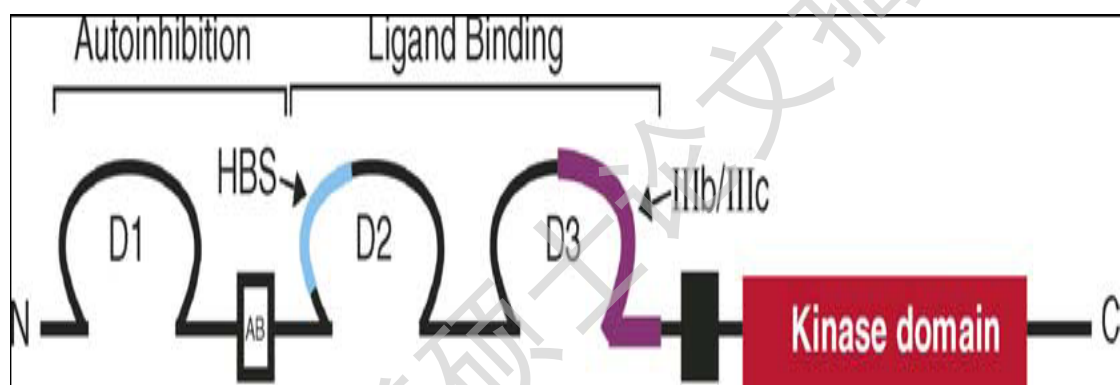


图 2 FGF 受体图^[14]

Fig.2 Schematic diagram of FGFR.

1.4 KGF 生物学功能

KGF的生物学活性主要有以下五点：①促进有丝分裂作用；②促进细胞迁移作用；③调控细胞分化作用；④抗凋亡作用；⑤细胞保护作用。其具体的生物学功能可以表现在以下几个方面：

1.4.1 KGF 与器官发育

KGF 与多种组织和器官的发育有关。在各器官的组织发育过程中，KGF参与了其分化调控作用。FGFR-2- III b 产生于胚胎形成期，开始呈弥散分布，逐渐聚集于由外胚层发育而来的器官上皮细胞上。而KGF 一般分布于邻近的间充质细胞，且一般晚于FGFR-2- III b 的表达。

胰管: Uzan, B等通过免疫定位PDX1和Glut2的方法, 检测得知KGF诱导胰管细胞的分化并且发现这一过程是通过PI3K/AKT途径实现的。KGF通过直接诱导PDX1的表达来实现胰管beta细胞的再生, 同时发现KGF分别通过MEK-ERK1/2和PI3K/AKT这两种不同的途径来实现胰管细胞增殖和分化的功能^[18]。

皮肤: KGF 与鳞状细胞角化和毛发长出相关。KGF 能增强皮肤毛囊和皮脂腺前体细胞的增殖和分化, 显著刺激人头皮毛囊发育^[14]。阿糖腺苷通过腺苷受体介导的毛发真皮乳头细胞 (dermal papillacells, DPCs) 的信号转导途径促进毛发生长, 阿糖腺苷的刺激作用增加了KGF 的基因表达水平, 可能通过增量调节DPCs 中KGF 水平刺激毛发生长^[13]。

卵泡: KGF在卵泡的发育过程中起了重要作用。用酶联免疫吸附法测定卵泡中的KGF时, 发现其在卵泡液中的浓度($2194 \pm 87 \text{ pg/mL}$) 远远高于其在血浆中的浓度($< 31.2 \text{ pg/mL}$), 证实卵巢卵泡中存在KGF^[19]。McGee 等研究了KGF对卵泡发育的影响, KGF可以抑制培养的卵泡的凋亡。用KGF处理后的卵泡直径可增加8%, 用卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 处理后可增加16%, 用KGF和FSH同时处理增加26%, 同时测量这3种情况下的抑制素- α 的含量, 抑制素- α 分别增加2 倍(用KGF)、4倍(用FSH)、12倍(用KGF + FSH)。结果表明, 用KGF处理可以提高培养的原始卵泡的生存、生长和分化。卵泡膜细胞制造的KGF可能在早期卵泡的发育过程中发挥了重要的作用^[20]。

乳房: KGF 诱导MAPK[细胞外调节信号激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1, 2] 持久激活作用, 而乳房形态形成与MAPK (ERK1, 2) 的持久激活作用密切相关^[21]。另外KGF 对于乳腺发育的促进作用与Lef1 依赖的Wnt 信号通路有关^[22]。

泌尿系统: KGF 与后肾间充质及输尿管芽的生长和成熟有关, KGF 和FGFR-2- III b 缺失将导致肾发育成具有较少集合管和肾单位的小肾^[23]。

肺: Mondrinos, M. J等应用包括生长因子、I型胶原、无血清培养基的3-D培养基建立了胚胎肺组织模型, 证明了KGF 是早期肺发育和肺泡II型上皮细胞 (alveolarepithelial type II cells, AEC II) 形态形成必需的正调控因子, 与肺早期分支形成、晚期上皮细胞分化及其表面蛋白合成密切相关, 诱导上皮结构扩张, 但不引起广泛出芽^[23]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库